〈第 37 回　山﨑賞〉

ミミズ由来酵素を用いたバイオマス分解の応用

静岡市立高等学校
科学探究科２年　樋川元気　他３名

1　研究動機

一般的なバイオエタノールの生成では化石燃料を用いているため、二酸化炭素の排出による地球温暖化の促進などが問題となっている。昨年度の研究によりミミズ由来酵素(セルロース分解酵素であるセルラーゼ)によって段ボールなどのバイオマスが糖化することがわかった。

今年度の研究は、バイオマスとミミズ酵素の反応により生成されたグルコースと酵母を用いてアルコール発酵を行い、エタノールを生成することで地球温暖化の改善につながると考えた。

2　目的

ミミズ由来酵素を用いた CMC(カルボキシメチルセルロース)の分解およびバイオエタノールの生成

3　実験Ⅰ

(1) 目的

自作のアルコール発酵装置を用いて二酸化炭素の発生量からおおよそのエタノール生成量を測定する

(2) 仮説

昨年度の研究よりバイオマスが糖化されたことから、ミミズ由来酵素により CMC が糖化されアルコール発酵によりエタノールが生成されると考えられる。

(3) 方法

殺菌したビーカー３つに CMC を 0.22g 秤量し、リン酸緩衝液 11.14g に溶解させ、凍結乾燥ミミズ酵素液 1.0g 添加した。(グルコースも同様)それぞれのビーカーにラップをかけ、恒温器 40℃に入れた。１日～３日反応後アルコール発酵を行い、エタノール生成量を算出した。(アルコール発酵では下記の装置を使用した)

図１　アルコール発酵装置

ツンベルク管の主室にドライイースト水溶液を 2.2g 入れ、副室にミミズ酵素反応液を 5.0g 入れ、アスピレーターでツンベルク管内を脱気して窒素を充填した。その後ゴムチューブをツンベルク管の口につなぎ、アルコール発酵($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$)により発生する二酸化炭素の発生量を食紅水の水位の変化から求め、反応式よりエタノール生成量を算出した。

(4) 結果

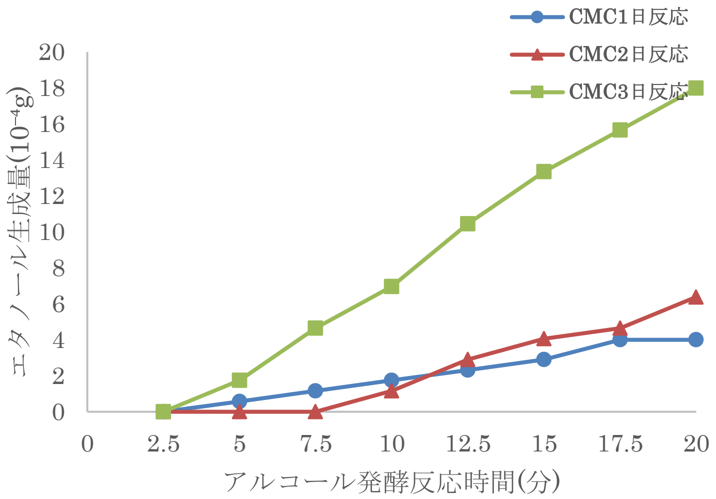

図２　アルコール発酵　結果

表１　エタノール生成量

	1日目	2日目	3日目
CMC(10^{-4}g)	4.0	6.4	18.0
グルコース(10^{-4}g)	53.7	45.7	63.2

CMC と凍結乾燥ミミズ酵素液の反応時間が長いほど、エタノール生成量は大きくなった。グルコースと凍結乾燥ミミズ酵素混合液をアルコール発酵させた結果からも糖が消費されていないことが分かった。（図２，表１）

(5) 考察

ミミズ由来酵素と CMC を３日間反応させ、40℃で 20 分間アルコール発酵を行うことでCMC0.83gから114.6μgの還元糖が生成され、CMCの7.06×10^{-3} %がエタノールに変換された。ミミズ酵素液と CMC を反応させる時間が長いほど二酸化炭素の発生量が増加したため、エタノールが生成されている可能性が考えられる。

4　実験Ⅱ

(1) 目的

ヨードホルム反応による実験Ⅰでのエタノールの存在確認

(2) 仮説

実験Ⅰよりエタノールが生成されたと考えられるため、ヨードホルム反応が見られると考えられる。

(3) 方法

CMC と凍結乾燥ミミズ酵素３日間反応液(以下ａ液)とグルコースと凍結乾燥ミミズ由来酵素３日間反応液(以下ｂ液)それぞれ５ml と２g のヨウ素液を反応させた。その際.60℃で５分間反応させた。その後、２mol/L 水酸化ナトリウム１ml と同様に反応させた。

(4) 結果

図３　ヨードホルム反応前
左:a 液　右:b 液

図４　ヨードホルム反応後
左:a 液　右:b 液

(5) 考察

黄色い沈殿とヨードホルム臭が確認されたことからエタノールが生成されたと分かった。

5　実験Ⅲ

(1) 目的

フーリエ変換赤外分光光度計を用いたエタノールの定量

(2) 仮説

エタノール生成濃度が分かり、エタノール生成効率を求められると考えられる。

(3) 方法

CMC と凍結乾燥ミミズ酵素３日間反応液(以下ｃ液) １週間反応させたもの(以下ｄ液)をフーリエ変換赤外分光光度計に通しエタノールに含まれる C-O 単結合の振動の量を検出した。

(4) 結果

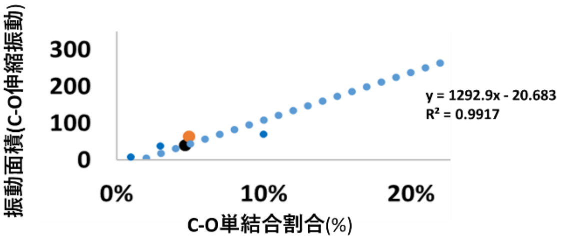

図５　C-O 割合検量線

表２　C-O 割合検量線

	c液	d液
C-O単結合の割合(%)	4.68%	4.94 %

ｃ液,ｄ液の C-O 単結合を含む物質の割合が求められた。(図５,表２)

(5) 考察

C-O 単結合を含む物質の割合は求められたが、C-O は CMC やグルコースにも含まれているため、エタノールの正確な量を求めることができなかった。

6　考察

実験Ⅰ～Ⅲを行ったことで、ミミズ由来酵素とバイオマスである CMC を反応させたものに酵母菌を添加してアルコール発酵したことで、エタノールが生成されたことの確認ができた。バイオマスである CMC がミミズ由来酵素により分解できたため段ボールなどのバイオマスでも同様に糖化し、そしてアルコール発酵によるエタノール生成ができると考えられる。

しかし、実験Ⅰの結果からミミズ由来酵素を用いてバイオマス分解をした場合はエタノール生成効率が 7.06×10^{-3} %であったのに対して、農林水産省の化石燃料を用いてバイオマス分解した場合のエタノール生成効率は 7.83 %であり、現在私たちが行っているミミズ由来酵素を用いる方法ではエタノール生成効率が低いことが分かった。原因としては、CMC とミミズ由来酵素反応時に菌や細菌がコンタミネーションすることや、酵素の最適温度が分かっていないことなどが考えられるため、それらを確認するための酵素の定性実験や、コンタミネーションしない方法を検討していきたい。

7　展望

フーリエ変換赤外分光光度計では、エタノール量を正確に定量できなかったため、エタノールを正確に定量できる方法である、ガスクロマトグラフィーを行う。そしてミミズ由来酵素を用いてバイオマスを分解した場合と、化石燃料を用いてバイオマスを分解した場合のエタノール生成効率を比較することでミミズ由来酵素の有用性を確かめたい。